

BEST AVAILABLE COPY  
(在)特許協力条約に基づいて公開された国際出願(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年1月8日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/002511 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 38/16, A61P 31/18, 37/04, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008259

(22) 国際出願日: 2003年6月30日 (30.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-189534 2002年6月28日 (28.06.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 若宮 伸隆 (WAKAMIYA,Nobutaka) [JP/JP]; 〒078-8345 北海道 旭川市 東光五条十丁目 1-4 Hokkaido (JP). 大谷 克

城 (OHTANI,Katsuki) [JP/JP]; 〒070-8012 北海道 旭川市 神居二条八丁目 2-8 SKハイツ B Hokkaido (JP). 坂本 隆志 (SAKAMOTO,Takashi) [JP/JP]; 〒633-0074 奈良県 桜井市 芝138 Nara (JP). 芥子 宏行 (KESHI,Hiroyuki) [JP/JP]; 〒558-0042 大阪府 大阪市 住吉区殿辻一丁目 4-14-6 O1 Osaka (JP). 岸雄一郎 (KISHI,Yuichiro) [JP/JP]; 〒640-8324 和歌山県 和歌山市 吹屋町 5-5 3-4 Wakayama (JP).

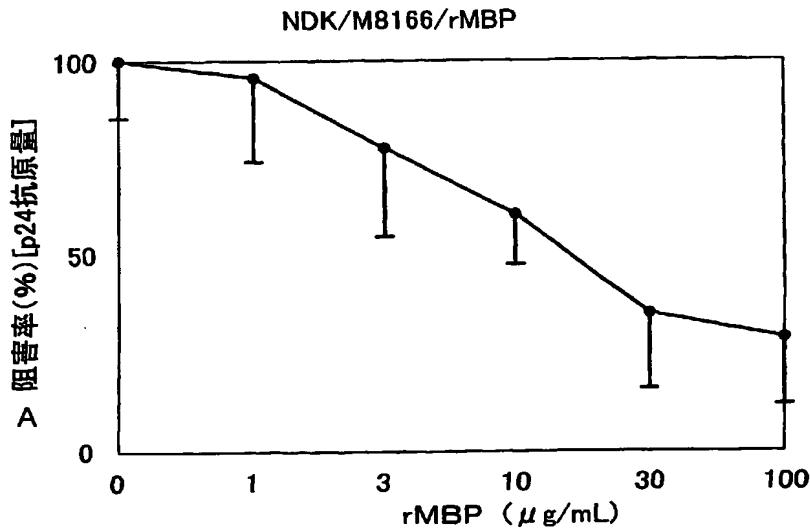
(74) 代理人: 角田 嘉宏, 外 (SUMIDA,Yoshihiro et al.); 〒650-0031 兵庫県 神戸市中央区東町 123番地の1 貿易ビル 3階 有古特許事務所 Hyogo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[統葉有]

(54) Title: ANTI-HIV AGENT

(54) 発明の名称: 抗HIV剤



A...INHIBITION RATE (%) [p24 ANTIGEN DOSE]

(57) **Abstract:** It is intended to disclose an anti-HIV agent which contains as the active ingredient a mannose-binding protein (MBP) and efficaciously contributes to the treatment of patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) and inhibits the progress of the disease. It is also intended to disclose a method of evaluating an anti-HIV activity exerted by the MBP which involves the step of culturing HIV-infected cells in the presence of the MBP.

[統葉有]

WO 2004/002511 A1



SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:  
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約: マンノース結合タンパク質(MBP)を有効成分として含み、ヒト免疫不全ウィルス(HIV)感染者の治療および病態進行を効果的に抑制する抗HIV剤が開示されている。また、HIV感染細胞をMBPの存在下で培養する工程を含む、MBPが奏する抗HIV活性の評価方法も開示されている。

## 明細書

## 抗HIV剤

5 技術分野

本発明は、マンノース結合タンパク質 (MANNOSE BINDING PROTEIN、以下、単に「MBP」と称する) の新規用途、特に、ヒト免疫不全ウィルス (HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS、以下、単に「HIV」と称する) を原因とする感染症の治療の際に用いる抗HIV剤でのMBPの利用に関する。

10

背景技術

MBPは、マンナン結合タンパク質、マンナン結合レクチン、マンノース結合レクチンなどと称されている物質であって、その分子内部にコラーゲン様構造およびカルシウム要求性の糖認識領域を有するC型レクチン、すなわち、

15 コレクチンに属する物質である [Kozutsumi, Y. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, pp. 658-664 (1980)]。

図4を参照すれば、MBPは、一般に、そのN末端側からC末端側 (図4の左端から右端) に向けて、N末端領域 (システインリッチ領域)、コラーゲン様領域、ネック領域、および糖認識領域(CRD)の4つの領域から構成され20 ている。そして、ネック領域およびコラーゲン様領域でのヘリックス構造によって、1本当たり約30kDa～約33kDaの3つのポリペプチドが分子間結合して、約90kDa～約99kDaの1つのサブユニット構造 (3量体) が形成されている。そして、このサブユニット構造の2～6個が、さらにブーケ様に結合してホモオリゴマー構造を形成している。

25 MBPに関するこれまでの基礎研究から、生体内に進入してきた微生物に対して、MBPは、当該微生物表面の糖鎖に結合して、補体系を活性化させて、微生物感染の初期防御に関与していることが示唆されている [Holmskov, U. et al., *Immunol. Today*, 15, pp. 67-74 (1994) および Turner, M. W. et

- al., *Immunol. Today*, 17, pp. 532-540 (1996)]。それに加えて、MBPの欠損者では、感染症が起こりやすいこと [Summerfield, J. A. et al., *Lancet*, 345, pp. 886-889 (1995)]、動脈硬化性アテローム患者にMBP欠損者が多いこと [Madsen, H. O. et al., *Lancet*, 352, pp. 959-960 (1998)]、MBP遺伝子変異によって重症マラリアになりやすいこと [Luty, A. J. et al., *J. Infect. Dis.*, 178, pp. 1221-1224 (1998)]、それに、MBP遺伝子変異により囊胞性線維症において肺での感染症を重症化させること [Garred, P. et al., *J. Clin. Invest.*, 104, pp. 431-437 (1999)]、などがこれまでに報告されている。
- さらに、MBPの治療薬用途に向けた検討として、MBP欠損患者にMBPを投与することで、補体依存性のオプソニン活性の正常化が起こり、易感染性が改善されることが報告されている [Valdimarsson, H. et al., *Scand. J. Immunol.*, 48, pp. 116-123 (1998)]。また、囊胞性纖維症の患者にMBPを投与したところ、患者の臨床症状は安定化したことも報告されている [Garred, P. et al., *Pediatr. Pulmonol.*, 33(3), pp. 201-207 (2002)]。
- ところで、HIVの感染者数は世界規模で年々増加し続けており、その多くは、発展途上国で発生しており、これらの国々では、後天性免疫不全症候群(AIDS)患者の急増という事態を招いている。特に、タイ国のクレイドE型と呼ばれるウィルス(サブタイプE型ウィルス)は、極めて感染力が高く、世界保健機構(WHO)では、サブタイプE型ウィルスによる感染者が、今後、世界で最も多くなると予測している。
- 日本では、欧米と同様に、サブタイプB型ウィルスによる感染者が多かつたが、最近になって、サブタイプE型ウィルスによる感染者も増加する傾向にある。
- HIV感染症に効果的に対応するには、新規の感染者数の発生を予防すること、すなわち、ワクチンの開発が緊急の課題とされている。とりわけ、米国やフランスなどでは、ワクチンの研究が積極的に進められているが、現在研究中のワクチンは、サブタイプB型ウィルスに対処するものであって、サ

ブタイプE型ウィルスに対するワクチンの研究は、未だにほとんどなされていないのが現状である。さらに、サブタイプD型ウィルスとしては、アジアや中央アフリカに主に分布している、劇症型を示すNDK株が知られている。

5 前述したように、サブタイプB型ウィルスは、広く世界に分布している実情があるにもかかわらず、未だにそのワクチンは研究中であり、その実用化がほど遠いのが現状である。また、サブタイプE型ウィルス、CRF01\_AEは、感染力が強く今後その感染範囲の拡大が予測されており、そして、サブタイプD型ウィルスには、劇症型を示すものがある。従って、このようなサブ  
10 タイプに属するウィルスに対して効果的な薬剤の開発も待望されているのが実情である。

また、エイズ(AIDS)ワクチンには、エイズウィルスのウィルス粒子をそのまま使う生ワクチン、ウィルス粒子の一部分を用いるコンポーネントワクチン、ウィルス遺伝子の組換えを行って得たりコンビナントワクチン、ウィルスを死滅させてその蛋白構造のみを保った死菌ワクチンなどが研究されている。  
15 しかしながら、それらの実用性を考慮すると、HIV感染の防御効果、すなわち、有効性（免疫能の誘導）のみならず、その安全性も考慮する必要がある。

現在のところ、エイズの治療においては、多剤併用療法(HAART)がよく使われている。HAART療法が提唱された当時は、画期的な化学療法と言われたが、現在では、薬剤耐性ウィルスの出現、HIVの高度ゲノム変異、長期および大量服用による副作用などの問題が認知されたことによって、使用する薬剤の選択および使用方法が極めて複雑になってきている。

HIVは、高度のゲノム多様性を有するウィルスであり、その原因是、主として2つあると考えられている。

まず第一に、HIVゲノムの複製エラーによる多様性の増大が挙げられる。通常、ゲノムRNAから逆転写酵素によってDNAが作られ、その後、宿主細胞ゲノムに組み込まれるという複製過程をとっている。逆転写酵素は、3'→

5'エキソヌクレアーゼ活性を欠いているため、複製された塩基配列に対する校正機能を有していない。また、逆転写酵素の基質特異性が低いので、逆転写反応の際に塩基の置換、欠失、挿入、重複などの変異が、極めて高頻度に発生する[Mansky, L. M., *J. Gen. Virol.*, 79, pp. 1337-1345 (1998)]。

5 しかも、HIVは、生体内で $10^9\text{--}10^1$ /日の割合で増殖し [Perelson, A. S. et al., *Science*, 271, pp. 1582-1586 (1996)]、年間300サイクルの複製が繰り返されていると考えられている。従って、HIVに感染すると同時に変異の蓄積がはじまり、さらなるゲノムの多様性が生じることとなる。

10 次に、異系統のウィルス間の遺伝子組換えによる多様性の増大が挙げられる。HIVが属するレトロウィルスの遺伝学的組換えは、通常、ウィルス粒子内への相同性のある2つのRNAゲノムの取り込みと、逆転写酵素による錆型乗り換え (template switch) 機能によって奏する強制コピー選択(forced copy choice) [Coffin, J. M., *J. Gen. Virol.*, 42, pp. 1-26 (1979)] と称するメカニズムとによって、高頻度に生じることが知られている [Jetz, 15 A. E. et al., *J. Virol.*, 74, pp. 1234-1240 (2000)]。従って、このような高度のゲノム多様性を獲得することで、HIVの準種性、サブタイプの分化、組換えウィルスの出現、薬剤耐性変異、CTLエスケープ変異などを引き起こすものと考えられている。

HIVは、遺伝学的系統によって、HIVタイプ1 (HIV-1) とHIVタイプ2 (HIV-2) の2種に大別され、HIV-1は、さらにグループM、グループOおよびグループNに分類される。

20 グループMは、HIV-1の中で最も主要なグループであり、サブタイプA～D、F～H、JおよびKの9種に分類されている。サブタイプAおよびFは、それぞれ、サブ-サブタイプA、A2およびF1、F2にさらに分類されてい 25 る。

なお、サブタイプEは、現在のところ、CRF01\_AEとして分類されつつあるので、本明細書では、サブタイプEを、「CRF01\_AE」(前出)とする。

HIV-2は、サブタイプA～Gに分類されている [Charneau, P. et al.,

Virology, 205, pp. 247-253 (1994) ; Gurtler, L. G. et al., J. Virol., 68, pp. 1581-1585 (1994) ; Simon, F. et al., Nat. Med., 4, pp. 1032-1037 (1998) ; Triques, K. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 16, pp. 139-151 (2000) ; Robertson, D. L. et al., Science, 288, pp. 55-56 (2000) ; Triques, K. et al., Virology, 259, pp. 99-109 (1999)]。

また、HIVの組換えウィルスの分類として、組換え型流行株 (CRFs : CRF01～CRF12)、孤立型組換えウィルス (URFs : URFsA/C, URFsA/D, URFsB/E, URFsB/C)、帰属不明の組換えウィルス (MAL株)、グループM/O間組換えウィルスなどが報告されている [Carr, J. K. et al., Virology, 247, pp. 22-31 (1998) ; Motomura, K. et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 16, pp. 1831-1843 (2000) ; Peeters, M. et al., J. Virol., 73, pp. 7368-7375 (1999) ; Takehisa, J. et al., J. Virol., 73, pp. 6810-6820 (1999) ; 武部豊、日本ウィルス学会雑誌, 50(2), pp. 123-138 (2001)]。

HIVの糖蛋白質として、エンベロープ糖蛋白質であるgp120と、膜貫通糖蛋白質であるgp41がある。これら糖蛋白質は、ウィルスゲノム状の「env」と称する遺伝子でコードされたgp160が、宿主のプロテアーゼで切断されて生じる [Hallenger, S. et al., Nature, 360, pp. 358-361 (1992)]。

gp120には、N-結合型糖鎖結合部位が24箇所存在し [Leonard, C. K. et al., J. Biol. Chem., 265, pp. 10373-10382 (1990)]、糖鎖はgp120分子の約半分を占めている [Allans, J. S. et al., Science, 228, pp. 1091-1094 (1985)] ので、HIVは糖鎖で覆われたウィルスであるといえる。HIVの標的細胞への感染には、gp120の糖鎖が必要であることが種々の実験により証明されている [Fennie, C. et al., J. Virol., 63, pp. 639-646 (1989) ; Matthews, T. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, pp. 5424-5428 (1987) ; Montefiori, D. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, pp. 9248-9252 (1988) ; Pal, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, pp. 3384-3388 (1989)]。

ところで、HIV-1粒子が細胞に感染する際の作用機構として、まず、細胞

膜上のCD4にgp120が結合し、次いで、コレセプター（ケモカインレセプター）にgp120のV3ループが結合し、次いで、gp41が細胞膜に侵入して膜融合を引き起こす、との一連の作用が考えられていい。これまでに多様なケモカインレセプターが報告されており、例えば、CCR5（マクロファージ指向性ウィルスのコレセプター）、CXCR4（T細胞指向性ウィルスのコレセプター）、CCR1、CCR2b、CCR3、CCR4、CCR8、CCR9、CXCR2、CXCR5、CXCR6/STRL33およびCX3CR1などが報告されている。HIVの分類方法として、前述した遺伝学的系統による方法の他に、これらケモカインレセプターに基づいて分類する方法もある。例えば、コレセプターとしてCCR5を介する10 ウィルスはCCR5（単にR5とも称する）指向性ウィルス、コレセプターとしてCXCR4を介するウィルスはCXCR4（単にX4とも称する）指向性ウィルス、同様にして、CCR1指向性ウィルス、CCR2b指向性ウィルスなどに分類される。これらの中でも、特に、R5指向性ウィルスは、マクロファージ指向性のウィルスであり、また、X4指向性ウィルスは、T細胞指向性ウィルスに分類される。また、R5X4指向性ウィルスは、マクロマージおよびT細胞の双方に対して指向性を示すウィルスに分類される。

MBPとHIVとの関係について、MBPのホモ遺伝子変異を有するヒトにおいてHIVの感染のリスクが高く、また、AIDS診断後の生存期間が短いことが報告されている [Garred, P. et al., *Lancet*, 349, pp. 236-240 (1997)]。しかし、その後、逆に遺伝子変異のあるグループの方がAIDSに移行しにくいという報告 [Mass, J. et al., *Aids*, 12, pp. 2275-2280 (1998)] がされたり、遺伝子変異とAIDSの予後とは関係ないという報告 [McBride, M. O. et al., *Int. J. STD. AIDS.*, 9, pp. 683-688 (1998)] もされている。さらに、MBPが、gp120と結合することが報告されている [Larkin, M. et al., *AIDS*, 3, 25 pp. 793-798 (1989); Mizuochi, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 264, pp. 13834-13839 (1989); Saifuddin, M. et al., *J. Gen. Virol.*, 81, pp. 949-955 (2000)]。

しかしながら、MBPによる抗HIV作用の有無、それに、MBPによるHIV増殖抑

制作用の有無については全く不明であった。これらは、MBPを抗HIV剤として利用する上での有用性を判定する際の最も重要な要素であるにもかかわらず、これまで、一切証明がなされていなかったことを指し示すものである。

また、MBPの抗HIV作用を評価できる評価系も存在していなかったので、

5 MBPを利用した抗HIV剤の開発が進展していない状況にあった。

また、HIVを薬剤治療するにあたって懸念される薬剤耐性ウィルスの出現、HIVの高度ゲノム変異、長期および大量服用による副作用などの問題が未解決のままである。さらに、ワクチンの開発も困難を極め、特に、サブタイプEの研究は全く進んでいないのが実情である。

10 ところで、R 5指向性ウィルスは中和抗体によって中和されにくく、病態進行に深く関わっていることが判明している。とりわけ、感染初期におけるR 5指向性ウィルスに対する治療方法が、患者の予後に重大な影響を及ぼすものと考えられているため、初期感染時でのR 5指向性ウィルスへの的確な対処が要求される。また、感染伝播するHIVのほとんどがCCR 5指向性ウ  
15 ィルスであることから、CCR 5が、予防治療や感染・伝播抑制の標的としても注目を浴びている。一方で、臨床経過が進行して病態が後期段階に近づくにつれて、CCR 5指向性ウィルスからCXCR 4指向性ウィルスへの移行が進み、後期段階に至ると、CXCR 4指向性ウィルスの存在が顕著となることが知られている。

20 このようなケモカインレセプターの存在が判明したのはごく最近であり、これらケモカインレセプターを標的とする治療薬の開発は、未だ基礎研究段階でしかない。これらケモカインレセプターの阻害剤についての開発も行われているが、CCR 5阻害薬を投与した場合には、CXCR 4指向性ウィルスの出現を速め、病態進行の助長に至ることが危惧されているなど、懸念すべき  
25 重大な問題が未解決のままとなっている。

それゆえ、臨床医からは上記した一連の問題を回避でき、しかも、安全でかつHIVウィルスのサブタイプ、ケモカインレセプターに対する指向性、それにマクロファージやT細胞への指向性などの諸要素に関係なく抗HIV作用

を示す薬剤の開発が切望されているのである。

とりわけ、サブタイプB型ウィルス、CRF01\_AE、サブタイプD型ウィルスに対して抗ウィルス作用を示す薬剤の開発、それに、CCR 5 指向性ウィルス、CXCR 4 指向性ウィルス、CCR 5 /CXCR 4 指向性ウィルスに抗HIV作用を示す薬剤の開発が望まれているのである。そして、同様に、マクロファージ指向性ウィルス、T細胞指向性ウィルス、マクロファージ/T細胞指向性ウィルスに対して抗HIV作用を示す薬剤の開発も待望されているのである。

### 発明の開示

10 本発明は、上記従来技術で指摘されていた問題点に鑑みて発明されたものであり、とりわけ、本発明者らは、MBPの抗HIV作用を定量可能な評価系を初めて確立したのである。また、その評価系を利用することで、MBPによる抗HIV作用、つまり、HIV増殖抑制作用を初めて証明して、抗HIV剤としてのMBPの用途を切り開いたのである。そして、本発明者らは、MBPが、サブタ  
15 イプE型HIVは勿論、その他のクレイド（サブタイプ）に属するHIVに対しても抗HIV作用を示すことを証明したのである。

すなわち、本発明の要旨とするところは、MBPを有効成分とする抗HIV剤にある。MBPを有効成分とする本発明の抗HIV剤によれば、MBPの標的が糖鎖であるため、HIVゲノム変異によるMBP耐性株の出現による影響を受けにくい  
20 点で有利である。また、MBPは、生体に常在する物質であるため、従来の化学療法に使用される化合物で認められる副作用が生じないという利点がある。

そして、本発明の他の態様によれば、抗HIV作用の評価方法、すなわち、

- (1) 標的細胞とHIVとを共存せしめて得られた感染細胞を培養し、  
25 (2) 培養した感染細胞を洗浄して清浄細胞を得、  
(3) 清浄細胞をMBPの存在下で培養し、および  
(4) 培養上清中のHIV由来のp 24蛋白を測定する、

工程を含んだ、MBPが奏する抗HIV作用の評価方法も提供される。

また、本発明の別の態様によると、抗HIV作用の他の評価方法、すなわち、

- (a) HIVとMBPとが共存する第一混合系を培養し、
- (b) 標的細胞とMBPとが共存する第二混合系を、好ましくは、第一混合系と並行して培養し、
- 5 (c) 第一混合系と第二混合系とを合一して感染細胞を得、
- (d) 得られた感染細胞を培養し、
- (e) 培養した感染細胞を洗浄して清浄細胞を得、
- (f) 清浄細胞を、好ましくは、MBPの存在下で培養し、および
- (g) 培養上清中のHIV由来のp24蛋白を測定する、

10 工程を含んだ、MBPが奏する抗HIV作用の評価方法も提供される。

これら評価方法によって、MBPが潜在的に保有している抗HIV作用が、客観的に容易に確認および検証することが可能となる。

#### 図面の簡単な説明

15 第1図は、HIV感染細胞NDK/M8166における組換え型マンノース結合タンパク質(rMBP)とHIV活性との相関を示すグラフである。

第2図は、HIV感染細胞LP65/M8166における組換え型マンノース結合タンパク質(rMBP)とHIV活性との相関を示すグラフである。

20 第3図は、HIV感染細胞NDK/M8166における天然型マンノース結合タンパク質(nMBP)とHIV活性との相関を示すグラフである。

第4図は、マンノース結合タンパク質の構造を示す概略図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の抗HIV剤は、有効成分として用いたMBPが奏するHIV増殖抑制作用、  
25 例えば、HIV中和作用やHIV発芽抑制作用などを利用するものであるため、エイズ患者およびHIV感染者の治療および病態進行の抑制に有用である。

また、本発明の抗HIV剤での有効成分であるMBPは、天然物および合成物(組換体を含む)の別を問わず、所定のHIV増殖抑制作用を奏するものであれば

いずれでも可能である。とりわけ、MBPとして、ヒト血清から単離および精製されたMBPや、動物細胞、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(以下、単に、「CHO細胞」と称する)から遺伝子工学的に分泌されたMBPが、本発明において好適に利用可能である。

- 5 本発明で適用可能なMBPの一つである組換え型ヒトマンナン結合タンパク質(以下、単に「rhMBP」と称する)は、例えば、国際公開公報第 WO 99/37676号を参照すれば、以下の工程、すなわち、(i) 天然型ヒトマンナン結合タンパク質(以下、単に「nhMBP」と称する)のcDNAの塩基配列(配列番号：1)の66bp～812bpに対応する747個の連続するポリヌクレオチド(配列番号：2)をプラスミドpNOW 1に挿入して、発現ベクターpNOW 1-hMBPを構築し、(ii) 発現ベクターpNOW 1-hMBPを、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損(dhfr<sup>-</sup>)のCHO細胞に導入して形質転換体を得、(iii) 得られた形質転換体をネオマイシンを含んだ培養培地にて培養して、ネオマイシン耐性細胞を取得し、(iv) 選択したネオマイシン耐性細胞をメトトレキセート(MTX)を含んだ培養培地にて培養して、メトトレキセート耐性の細胞を取得し、および(v) 選択したメトトレキセート耐性細胞からrhMBPを回収する、との一連の工程を経ることによって製造可能である。

前述した製造方法の詳細は、以下のように説明される。

- まず、発現ベクターpNOW 1-hMBPの構築を行う。nhMBPを構成するアミノ酸は、Hermanらによって、すでに解析および報告されている[Sastry *et al.*, "The human mannose-binding protein gene. Exonstructure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10", *J. Exp. Med.* 170(4), pp. 1175-1189 (1989)]。nhMBPを構成するアミノ酸配列を、配列番号：3に示した。

- これら配列情報を踏まえて、ヒト肝臓cDNAライブラリー(クローンラック社製)から、nhMBPの開始コドンからストップコドンまでを増幅させ、得られたnhMBPのcDNAを制限酵素で消化して、nhMBPのcDNAの66～812bpに対応する747個の連続するポリヌクレオチド(配列番号：2)を取得し、これを挿

入体とする。 次に、発現ベクターpNOW 1を、制限酵素で消化して、pCMVとBGPポリAの間に、前述の挿入体をDNAライゲーションキット（宝酒造製）を用いて挿入する。 このようにして得られた発現ベクターを、プラスミpNOW 1-hMBPと命名する。

- 5 次に、発現クローンの選択を行う。 ジヒドロ葉酸還元酵素欠損 ( $dhfr^-$ ) のCHO細胞への発現ベクターpNOW 1-hMBPの導入は、以下のようにして行う。ウシ胎児血清添加IMDM培地 (GIBCO社) を調製し、これに ( $dhfr^-$ ) DG44 CHO細胞株を混合し、37°Cで、5%炭酸ガスの条件下で、24時間培養する。 培養上清を廃棄して、その代わりに、発現ベクターpNOW 1-hMBPをリポフェクチン溶液に混合して、これに予め調製しておいた溶液を含むFCS添加IMDMを加え、さらにヒポキサンチン (GIBCO社製) とチミジン (GIBCO社製) を加えた後に培養を行って、 $dhfr^-$ の宿主CHO細胞への発現ベクターpNOW 1-hMBPの導入を行う。 その後、培養上清を廃棄し、FCS、ヒポキサンチン、チミジン添加IMDMを加え、さらに培養を行う。
- 10 15 ネオマイシン (G418) 耐性CHO細胞を取得するために、発現ベクターpNOW 1-hMBPが導入された細胞を培養した後、これをトリプシン処理し、ネオマイシン (G418) を含むFCS添加IMDMで細胞を懸濁する。 この懸濁物を、その後、マイクロプレートに播種し、37°C、5%炭酸ガス ( $CO_2$ ) の条件下で、2週間培養することで、ネオマイシン耐性の細胞（クローン）が出現する。
- 20 25  $r$ hMBPの產生が確認されたクローンの中からいくつかを選択し、各クローンの培養を行う。 各培養上清を廃棄し、前出のものと同じ組成のFCS添加IMDMを加え、4日間培養し、その培養上清を回収する。 回収した培養上清中の $r$ hMBPの產生量を測定する。 なお、 $r$ hMBPの產生量は、対照としてのnhMBP、コレクチンの糖認識領域(CRD)とネック領域に対する（大腸菌で発現させた）抗ウサギポリクローナル抗体およびnhMBP（定量対象）を用いて、鈴木らの方法 [Y. Suzuki, et al., "Characterization of Recombinant Bovine Conglutinin Expressed in a Mammalian Cell", Biochem. Biophys. Res. Commun., 238, pp. 856-863 (1997)] に準じて定量することができる。

メトトレキセート耐性のCHO細胞の取得には、rhMBP産生クローンをさらに継代培養して安定化させた後、低濃度のメトトレキセートを培地に加えて遺伝子増幅を行う。まず、メトトレキセート、ネオマイシン（G418）を加えた10%透析済FCS（JRHバイオサイエンス社製）添加IMDMに、選択した各細胞5 クローンを混合し、播種した。37°C、5%炭酸ガス（CO<sub>2</sub>）の条件下で、2週間培養を行うことにより、メトトレキセート耐性の細胞（クローン）が現れる。これらメトトレキセート耐性のクローンのrhMBP産生性を確認すると、高水準の産生レベルが確認される。

これらクローンから任意のクローンを選択し、それぞれを播種し、2週間10 培養する。培養上清を廃棄し、前出のものと同じ組成のFCS添加IMDM（メトトレキセート、ネオマイシン（G418）を加えたもの）を加え、4日間培養し、その培養上清を回収し、rhMBPの産生レベルを確認する。

rhMBPを精製するために、得られたクローンの中で最も産生効率の高いクローンを、播種し、培養する。そして、培養上清を廃棄し、メトトレキセート、ネオマイシン（G418）を含むCHO-S-SFM II培地（ビタミンCを添加15 する場合は終濃度が100mMになるようにビタミンCを添加）を加え、4日間培養する。その培養上清を回収し、TBS（TBS powder（宝酒造社製）より調製）に対して透析を行い、次いで、TBSC（5 mM CaCl<sub>2</sub>、TBS）に対して透析を行う。その後、マンナンーアガロース（SIGMA社製）により精製を行う。す20 なわち、マンナンーアガロースをカラム（Column PD-10、Empty、ファルマシア社製）に詰め、そこに透析済の培養液を通し、TBSCで洗浄後、TBSE（10 mM EDTA、TBS）で溶出する。溶出後、終濃度が15mMになるように1M CaCl<sub>2</sub>を加える。そして、再度、マンナンーアガロースに適用し、TBSCで洗浄後、100mMのマンノースを含むTBSで溶出する。その後に、改めて、TBSCに対し25 て透析を行って、rhMBPの精製品を得る。

このようにして得られた精製rhMBPは、ゲルfiltrationクロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度が、1,000～1,300kDaの分子量、特に1,150kDaの分子量にて特異的なピークを示す。また、200～400kDaの分子量、特に300

kDaの分子量にて特異的なピークを示す。 なお、rhMBPのゲルfiltrationクロマトグラフィー分析は、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.15mM NaCl、5 mM EDTAを用い、流速0.5ml/分で、スупーロース6 HR10/30 (φ10mm×長さ300mm; ファルマシア社製) の条件で実施する。 そして、40μgのrhMBPを、このカラムに流し、280nmの吸光度で測定する。

なお、国際公開公報第 WO 99/37676 号に記載の方法に従って合成されたrhMBPを、本発明の抗HIV剤の有効成分として使用する場合には、前出の精製rhMBPを用いるのが好ましい。 この精製rhMBPを、さらにゲルfiltrationクロマトグラフィーに適用した際に得られる、280nmでの吸光度測定によって、1,000～1,300kDaの分子量に現れる分画物、200～400kDaの分子量に現れる分画物、またはこれら分画物の双方を含む精製rhMBPを用いることもできる。

そして、本発明の抗HIV剤は、いずれのタイプのHIV株に対しても有効に作用するものであるが、後述の実施例の記載からも明らかのように、HIV-1のグループMのサブタイプBに属するHIVの他、HIV-1のグループMのサブタイプDに属するHIVや、組換え型流行株、特に、CRF01\_AE株に対して顕著な抗HIV作用を奏する。

また、本発明の抗HIV剤は、CCR 5 指向性ウィルス、CXCR 4 指向性ウィルス、およびCCR 5 /CXCR 4 指向性ウィルスに対しても顕著な抗HIV作用を奏する。 さらに、本発明の抗HIV剤は、マクロファージ指向性ウィルス、T細胞指向性ウィルス、およびマクロファージ/T細胞指向性ウィルスに対しても、同様に顕著な抗HIV作用を呈する。

本発明の抗HIV剤を、エイズ治療剤またはHIV感染の病態進行抑制剤として用いる場合、生体へのタンパク質の取り込みに好都合な剤型および投与経路（静脈内投与など）を選択するのが好ましい。 例えば、本発明の医薬組成物の投与方法として、静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与、経口投与などが適宜選択でき、その投与方法に応じて、種々の形態の製剤として用いることができる。 以下に、静脈投与製剤について記載するが、本発明において用いられる剤型は、これらに限定

されるものではなく、医薬製剤分野において通常用いられる各種製剤を利用することができます。

日本人（479例）におけるMBPの遺伝子変異および血中MBP濃度を検討したところ、MBPの遺伝子変異は、コドン54（GGC→GAC）にのみ認められ、各ジエノタイプの比率は、Wild/Wildで70.8%、Wild/mutantで22.5%、mutant/mutantで6.7%であることが報告されている。また、血中MBP濃度は、Wild/Wildで0.18～4.35 μg/ml（平均1.26 μg/ml）、Wild/mutantで0.00～0.80 μg/ml（平均0.23 μg/ml）、mutant/mutantで0.00～0.20 μg/ml（平均0.04 μg/ml）であることも報告されている〔芥子宏行ら、医学のあゆみ, 194(12), 10 pp. 957-958 (2000)〕。

本発明の抗HIV剤を、エイズ治療剤またはHIV感染後の病態進行抑制剤として用いる場合、本発明の抗HIV剤の静脈内投与量は、健常人の血中MBP濃度が約1 μg/ml～約1.5 μg/mlであるので、血中MBP濃度をELISAなどの手法により測定した後、C型肝炎などの肝障害によりMBPの産生量が低下したり、あるいは遺伝子変異によって血中濃度が低い場合には、まずは、血中MBP濃度を約1 μg/ml～約1.5 μg/mlとなるように投与量を決定してもよい。そして、HIV-RNA量およびCD4陽性細胞数を定期的にモニタリングし、モニタリングの結果とMBP投与量との関係を把握した上で、有効血中MBP濃度値を決定する必要がある。血中MBP濃度が正常値であれば、徐々に血中濃度を高くして（例えば、約1.5 μg/ml～約5.0 μg/ml）、HIV-RNA量およびCD4陽性細胞数を定期的にモニタリゲし、モニタリングの結果とMBP投与量との関係を把握した上で、有効血中MBP濃度値を決定すればよい。

MBPの有効血中濃度は、個人が生来有する血中MBP濃度に左右されるため一定するものではないが、好ましくは、約1.0 μg/ml～約50 μg/ml、より好ましくは、約1.5 μg/ml～約10 μg/mlに設定するのが好ましく、投与直前または投与直後の血中濃度は、これらの範囲外であってもよい。さらに、遺伝子変異によっても、血中MBP濃度の低下が認められることから、MBPの投与量は、遺伝子変異も考慮して決定すべきである。

また、その剤型（経口投与剤、注射剤、座剤等の公知の剤型）に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤などの添加剤を、製剤原料として加えること  
5 ができる。

このような添加剤の具体例を、以下に例示するが、これらに限定されるものではない。

溶 剤： 精製水、注射用水、生理食塩水、ラッカセイ油、エタノール、グリセリン。

10 賦 形 剤： デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトール。

コーティング剤： 白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロース、および上掲の高分子賦形剤。

15 基 剤： ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤。

結 合 剤： デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴム等の天然高分子化合物、ポリビニルピロリドン等の合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ。  
20

滑 沢 剤： ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、コムギデンプン、マクロゴール、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール。

25 崩 壊 剤： デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架

橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロース。

溶解補助剤：シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール。

5 懸濁化剤：アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤。

10 粘稠剤：カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム。

乳化剤：アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチン。

安定剤：亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質。

15 緩衝剤：リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸。

等張化剤：塩化ナトリウム、ブドウ糖。

無痛化剤：塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコール。

20 保存剤：安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エスチル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサール。

矯味剤：白糖、サッカリン、カンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリン。

芳香剤：トウヒチンキ、ローズ油。

着色剤：水溶性食用色素、レーク色素。

25 本発明の抗HIV剤は、上掲した成分に加えて、製薬上許容される塩を含有することも可能である。 製薬上許容される塩(類)としては、例えば、無機塩基、有機塩基等の塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩等が挙げられる。 このような塩(類)の具体例を、以下に

例示するが、これらに限定されるものではない。

無機塩基：ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム、アンモニウム等。

5 有機塩基：エタノールアミン等の第一級アミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシリルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン等の第二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミン等の第三級アミン。

10 無機酸：塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸。

有機酸：ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマール酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸。

15 塩基性アミノ酸：アルギニン、リジン、オルニチン。

酸性アミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸。

### 実施例

以下に、本発明を実施例に沿って具体的に説明するが、これら実施例の開示によって本発明が限定的に解釈されるべきでないことは勿論である。

ところで、以下の実施例において実証された抗HIV作用の語は、HIVに対する中和作用のみならず、HIVに対する発芽抑制作用をも包含するものであるが、便宜上、単に「中和作用」と記載する。

また、実施例1および2で用いたHIV株の詳細を、表1にまとめた。

表 1

ウィルス株	指 向 性	ケモカインレセプター	サブタイプ
92Th014	マクロファージ	CCR5	B
5 JRCSF	マクロファージ	CCR5	B
	マクロファージ / T細胞	CCR5 / CXCR4	E
	マクロファージ / T細胞	CCR5 / CXCR4	D

実施例 1

10 本実施例では、MBPによる抗HIV活性を検討した。

まず、HIV株として、HIV-NDK実験株（サブタイプD；以下、単に「NDK」と称する）と、組換え型流行株CRF01\_AE（臨床分離株；以下、単に「LP65」と称する）とを準備した。

15 次に、これらHIV株で、フィトヘマグロチニン（phytohemagglutinin(PHA)）でプラスト化したヒト末梢血単核球（ヒトPBMC；以下、単に「PBMC」と称する）とT細胞系の株化細胞M8166（以下、単に「M8166」と称する）を、それぞれ感染させた。

なお、NDKとM8166の双方は、米国国立衛生研究所(NIH)のAIDS Research and Reference Reagent Programより入手可能な株である。

20 ところで、MBPとしては、ヒト血液より精製したnhMBPと、国際公開公報第WO 99/37676号に記載の方法により合成されたrhMBPを用いた。

劇症型ウィルスであるNDKを、PBMCおよびM8166にそれぞれ添加し、これらを、37°Cで、1時間培養して感染させて得られた感染株を、それぞれNDK/PBMCおよびNDK/M8166と称する。また、LP65を、PBMCおよびM8166にそれぞれ添加し、これらを37°Cで、1時間培養することによってHIV感染させた。なお、NDKおよびLP65の双方共に、100 TCID<sub>50</sub>のウィルスに相当する量を、5×10<sup>6</sup>個/mlの細胞に対して添加した。得られた感染細胞を、それぞれ「LP65/PBMC」および「LP65/M8166」と命名した。

その後、感染細胞を、PBSで2回洗浄した。 次に、4種のウィルス感染細胞（NDK/PBMC、NDK/M8166、LP65/PBMC、LP65/M8166）に、nhMBPまたはrhMBPを、 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度（図1）または $1 \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度（図2～図3）で添加した。 この時の細胞の濃度は、 $200 \mu\text{l}$ 当たり $1 \times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ の濃度（すなわち、 $2 \times 10^6$ 個/ $200 \mu\text{l}$ ）である。 つまり、 $1/5$ 規模の $200 \mu\text{l}$ の系内に、MBP  $1 \sim 100 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ またはMBP  $1 \sim 30 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ 個/ $\text{ml}$ の濃度の細胞を置き、これをヒト血清添加培地で、 $37^\circ\text{C}$ 、5%炭酸ガス存在下、1週間培養した。 培養後のウィルス量の変化の指標として、培養上清中のHIV由来のp24抗原量を全自动化学発光酵素免疫測定システム（ルミパスf：富士レビオ社製）を用いてELISA測定し、MBP非添加群と比較した。

その結果、図3に記載のグラフにあるように、nhMBP添加群にてHIV量の抑制（HIV増殖抑制）が認められた。 また、図1に記載のグラフから見てとれる通り、NDK/M8166については、rhMBP濃度が $10 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の場合、培養上清中のp24抗原量が、培養後速やかにrhMBP非添加群の約50%にまで抑制されていたことが確認された。 さらに、図2に記載のグラフから明らかなように、臨床分離株LP65（HIV-1の組換え型流行株CRF01\_AE）についても、rhMBPは、LP65を濃度依存的に中和するIC<sub>50</sub>が、約 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で抗HIV効果（HIV増殖抑制効果）が認められ、つまり、その抗HIV作用（中和作用）はサブタイプに関係なく認められた。

また、使用したMBP濃度範囲においては、nhMBPおよびrhMBPのいずれでも、細胞に対する顕著な増殖抑制や細胞毒性は認められなかった。 加えて、本実験系においては、HIVの発芽抑制作用、つまり、感染細胞からのHIVの放出抑制作用も示唆されていた。

以上のことから、本発明の抗HIV剤が、サブタイプE型HIVおよびサブタイプD型HIVの双方に対して抗HIV作用を示すことが明らかとなった。 同様に、本発明の抗HIV剤が、CCR5/CXCR4指向性ウィルス、それに、マクロファージ/T細胞指向性ウィルスに対しても抗HIV作用を示すことも明らかとなつたのである。

## 実施例 2

HIV株として、92Th014実験株（サブタイプB）とJRCSF実験株（サブタイプB）を準備した。なお、これら実験株は、そのいずれもが、米国国立衛生研究所のAIDS Research and Reference Reagent Programより入手可能である。  
5 また、PBMC、nhMBPおよびrhMBPは、実施例1に記載のものを用いた。

まず、100 TCID<sub>50</sub>の力値に相当するウィルス溶液50 μlと、その終濃度を2、6、20、60 μg/mlの濃度としたnhMBPまたはrhMBPの溶液50 μlとを混合した。次いで、この混合溶液を、37°C、5%炭酸ガス存在下で、1時間培養して、nhMBPまたはrhMBPの終濃度が1、3、10、30 μg/mlに調整された第  
10 一混合系を調製した。

これと並行して、PBMCを2×10<sup>5</sup>個/50 μlの濃度に調整し、これに、その終濃度を2、6、20、60 μg/mlの濃度としたnhMBPまたはrhMBPの溶液50 μlとを混合した。次いで、この混合溶液を、37°C、5%炭酸ガス存在下で、1時間培養して、nhMBPまたはrhMBPの終濃度が1、3、10、30 μg/mlに調整  
15 された第二混合系を調製した。

次に、双方のMBP濃度（終濃度）が共に1、3、10、30 μg/mlのいずれかに調整された第一混合系と第二混合系液とを合わせて、37°Cで一昼夜培養した後、未反応のMBPとウィルスを洗浄除去した。洗浄後、洗浄前のMBP終濃度と同じになるように、新鮮なnhMBPまたはrhMBPを添加し、10%FCS含有RPMI  
20 培地（インターロイキン-2を20単位/ml、ペニシリンを50単位/ml、ストレプトマイシンを50単位/ml含有）で7日間培養した。培養後のウィルス量変化の指標として、培養上清中のHIV由来のp 24抗原量を、全自动化学発光酵素免疫測定システム（ルミパルス f：富士レビオ社製）を用いてELISA測定し、MBP非添加群と比較した。

25 その結果、野生株ウィルスであるJRCSFおよび92Th014のいずれのウィルスに対しても有意な抗HIV活性（HIV増殖抑制活性）が認められた。p 24抗原量を半減させるのに必要なMBPの量（50%抑制濃度）は、JRCSFの場合、nhMBPで0.19 μg、rhMBPで2.74 μg以下であった。同様に、92Th014の場

合、nhMBPで $7\text{ }\mu\text{g}$ 、rhMBPで $1.57\text{ }\mu\text{g}$ 以下であった。これらのことから、MBPは、野生型サブタイプBのウィルス株に対しても優れた抗HIV活性（中和活性）を示すことが明らかとなった。

また、本実施例での結果から、本発明の抗HIV剤は、CCR 5 指向性ウィルス、  
5 それに、マクロファージ指向性ウィルスに対しても抗HIV作用を示すことが  
明らかとなった。さらに、本実施例にあっては、MBPがCCR 5 指向性ウィル  
スに対して抗HIV用を示すことを直接的に証明していることから、MBPをHIV  
感染初期の治療のみならず、予防治療や感染・伝播抑制に対しても効果的に  
使用できることが判明したのである。さらに、本実施例では、本発明の抗  
10 HIV剤が、CCR 5 /CXCR 4 指向性ウィルスに対しても抗HIV作用を呈することを  
直接的に証明できたことから、HIV感染の感染初期のみならず、臨床経過が  
進行した病態においてもなお（つまり、HIV感染者のみならずHIV患者にも）  
効果的であることが明らかになったのである。

実施例 1 および実施例 2 で得られた結果から、CCR 5 /CXCR 4 指向性ウィル  
15 スに対して抗HIV作用を示したMBPは、CCR 5 指向性ウィルスに対しても同様  
の抗HIV作用を示したことから、MBPはCXCR 4 指向性ウィルスに対しても抗  
HIV作用を示すものと考えられる。同じく、マクロファージ／T細胞指向  
性ウィルスに対して抗HIV作用を示したMBPは、マクロファージ指向性ウィル  
スに対しても同様の抗HIV作用を示したことから、MBPはT細胞指向性ウィル  
20 スに対しても抗HIV作用を示すものと考えられる。

実施例 1 および実施例 2 での実験結果から、本発明の抗HIV剤が、CCR 5 指  
向性ウィルス、CXCR 4 指向性ウィルス、それに、CCR 5 /CXCR 4 指向性ウィル  
スに対しても抗HIV作用を示すことが明らかになったのである。加えて、  
本発明の抗HIV剤は、マクロファージ指向性ウィルス、T細胞指向性ウィル  
ス、そして、マクロファージ／T細胞指向性ウィルスに対して抗HIV作用を  
25 示すことも判明したのである。

### 産業上の利用可能性

MBPを有効成分とする本発明の抗HIV剤は、活性の中和が最も困難とされている組換え型流行株CRF01\_AEウイルスを含む多様なHIV株に対して中和活性を示す。つまり、本発明の抗HIV剤は、ウイルスのサブタイプ、ケモカイ

5 ンレセプター指向性、マクロファージ/T細胞指向性の種類・程度に関係なく、とりわけ、現在のところ最も懸案となっている、サブタイプB型HIV、サブタイプD型HIV、それに、CRF01\_AEに対して所定の抗HIV作用を呈する。

また、本発明の抗HIV剤は、CCR 5 指向性ウイルス、CXCR 4 指向性ウイルス、それに、CCR 5 /CXCR 4 指向性ウイルスに対しても抗HIV作用を示す。さら

10 に、本発明の抗HIV剤は、マクロファージ指向性ウイルス、T細胞指向性ウイルス、そして、マクロファージ/T細胞指向性ウイルスに対しても抗HIV作用を示す。

また、本発明の抗HIV剤は、糖鎖を標的にしているため、HIVゲノム変異によるMBP耐性株の出現の可能性が小さい。それに加えて、MBP自体が生体内に常在するため、従来のHIV治療で利用されていた化合物に認められた副作用もない。

このように、本発明の抗HIV剤は、HIVを原因とする感染症に多様に対応可能であり、その治療において極めて有用なものである。

## 請求の範囲

1. マンノース結合タンパク質（M B P）を有効成分とする抗H I V剤。
- 5 2. 前記M B Pが、H I V増殖抑制作用を有する請求項1に記載の抗H I V剤。
3. 前記増殖抑制作用が、H I V中和作用である請求項2に記載の抗H I V剤。
- 10 4. 前記増殖抑制作用が、H I V発芽抑制作用である請求項2に記載の抗H I V剤。
5. 前記M B Pが、ヒト血清から単離および精製される請求項1または2に記載の抗H I V剤。
- 15 6. 前記M B Pが、動物細胞から遺伝子工学的に分泌される請求項1または2に記載の抗H I V剤。
- 20 7. 前記動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項6に記載の抗H I V剤。
8. 前記H I Vが、H I Vタイプ1のグループMのサブタイプBに属するH I V株である請求項1または2に記載の抗H I V剤。
- 25 9. 前記H I Vが、H I Vタイプ1のグループMのサブタイプDに属するH I V株である請求項1または2に記載の抗H I V剤。

10. 前記H I Vが、組換え型流行株である請求項1または2に記載の抗H I V剤。

11. 前記組換え型流行株が、CRF01\_AEである請求項10に記載の抗H I V剤。

5

12. 前記H I Vが、CCR5に対して指向性を有するウイルスである請求項1または2に記載の抗H I V剤。

13. 前記H I Vが、CXCR4に対して指向性を有するウイルスである請求項1または2に記載の抗H I V剤。

14. 前記H I Vが、CCR5およびCXCR4の双方に対して指向性を有するウイルスである請求項1または2に記載の抗H I V剤。

15 15. 前記H I Vが、マクロファージに対して指向性を有するウイルスである請求項1または2に記載の抗H I V剤。

16. 前記H I Vが、T細胞に対して指向性を有するウイルスである請求項1または2に記載の抗H I V剤。

20

17. 前記H I Vが、マクロファージおよびT細胞の双方に対して指向性を有するウイルスである請求項1または2に記載の抗H I V剤。

18. MBPの抗H I V作用の評価方法であって、以下の工程、すなわち、

- 25 (1) 標的細胞とH I Vとを共存せしめて得られた感染細胞を培養し、  
(2) 培養した感染細胞を洗浄して清浄細胞を得、  
(3) 清浄細胞をMBPの存在下で培養し、および  
(4) 培養上清中のH I V由来のp24蛋白を測定する、

工程を含む、ことを特徴とするM B Pの抗H I V作用の評価方法。

19. M B Pの抗H I V作用の評価方法であつて、以下の工程、すなわち；

- (a) H I VとM B Pとが共存する第一混合系を培養し、
- 5 (b) 標的細胞とM B Pとが共存する第二混合系を培養し、
- (c) 第一混合系と第二混合系とを合一して感染細胞を得、
- (d) 得られた感染細胞を培養し、
- (e) 培養した感染細胞を洗浄して清浄細胞を得、
- (f) 清浄細胞を培養し、および
- 10 (g) 培養上清中のH I V由来のp 24蛋白を測定する、

工程を含む、ことを特徴とするM B Pの抗H I V作用の評価方法。

20. 前記工程(a)および(b)が、並行して実施される請求項19に記載の評価方法。

15

21. 前記工程(f)が、清浄細胞をM B Pの存在下で培養する請求項19または20に記載の評価方法。

22. 前記抗H I V作用が、H I V増殖抑制作用である請求項18または19に記載の評価方法。

23. 前記増殖抑制作用が、H I V中和作用である請求項22に記載の評価方法。

24. 前記増殖抑制作用が、H I V発芽抑制作用である請求項22に記載の評価方法。

25. 前記M B Pが、ヒト血清から単離および精製される請求項18または19に記載の評価方法。

26. 前記M B Pが、動物細胞から遺伝子工学的に分泌される請求項18または19に記載の評価方法。

27. 前記動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞である請求項26に記載の評価方法。

28. 前記H I Vが、H I Vタイプ1のグループMのサブタイプBに属するH I V株である請求項18または19に記載の評価方法。

10 29. 前記H I Vが、H I Vタイプ1のグループMのサブタイプDに属するH I V株である請求項18または19に記載の評価方法。

30. 前記H I Vが、組換え型流行株である請求項18または19に記載の評価方法。

15

31. 前記組換え型流行株が、CRF01\_AEである請求項30に記載の評価方法。

32. 前記H I Vが、CCR5に対して指向性を有するウィルスである請求項18または19に記載の評価方法。

20

33. 前記H I Vが、CXCR4に対して指向性を有するウィルスである請求項18または19に記載の評価方法。

25 34. 前記H I Vが、CCR5およびCXCR4の双方に対して指向性を有するウィルスである請求項18または19に記載の評価方法。

35. 前記H I Vが、マクロファージに対して指向性を有するウィルスである請求項18または19に記載の評価方法。

36. 前記H I Vが、T細胞に対して指向性を有するウィルスである請求項18

または19に記載の評価方法。

37. 前記H I Vが、マクロファージおよびT細胞の双方に対して指向性を有

するウィルスである請求項18または19に記載の評価方法。

38. 請求項18または19に記載の評価方法によって決定された抗H I V作用を

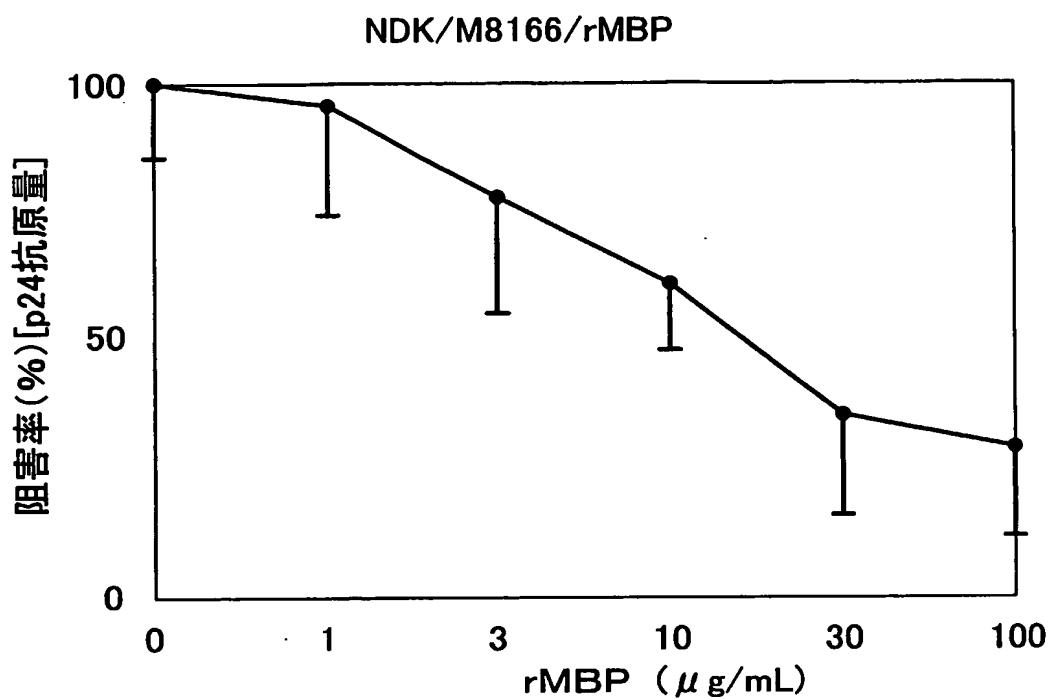
有するM B P。

10 39. M B P を有効成分とする抗H I V剤のH I V感染者への使用。

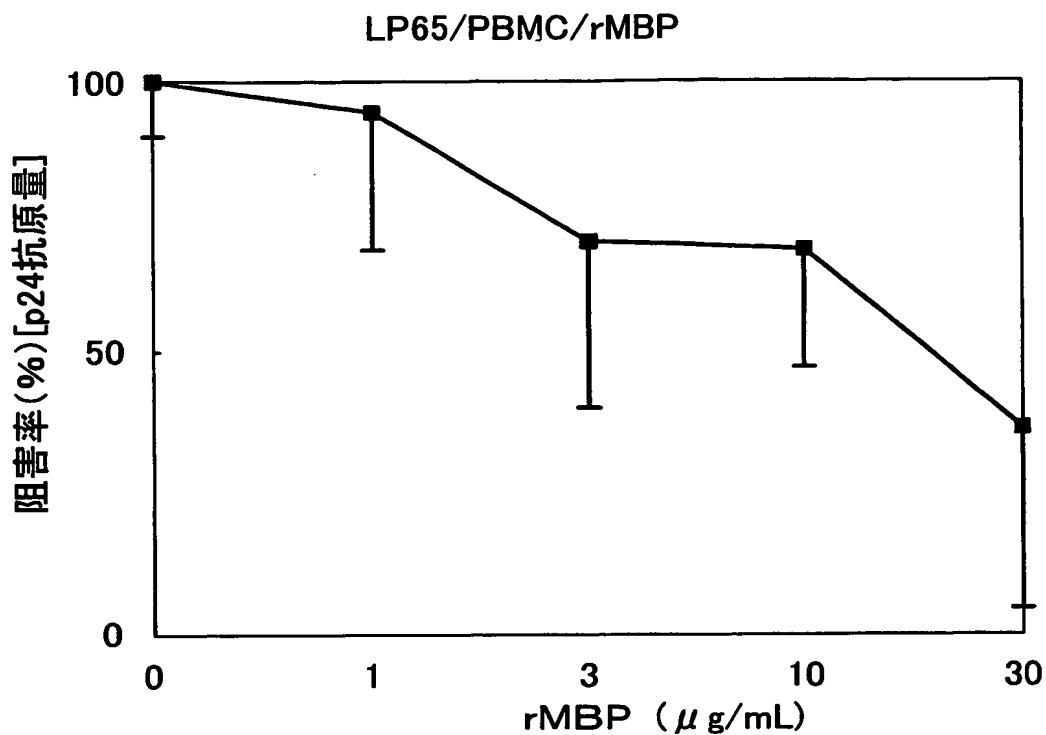
40. 前記H I V感染者が、CCR5 に対して指向性を有するウィルスによる

罹患者である請求項39に記載の抗H I V剤の使用。

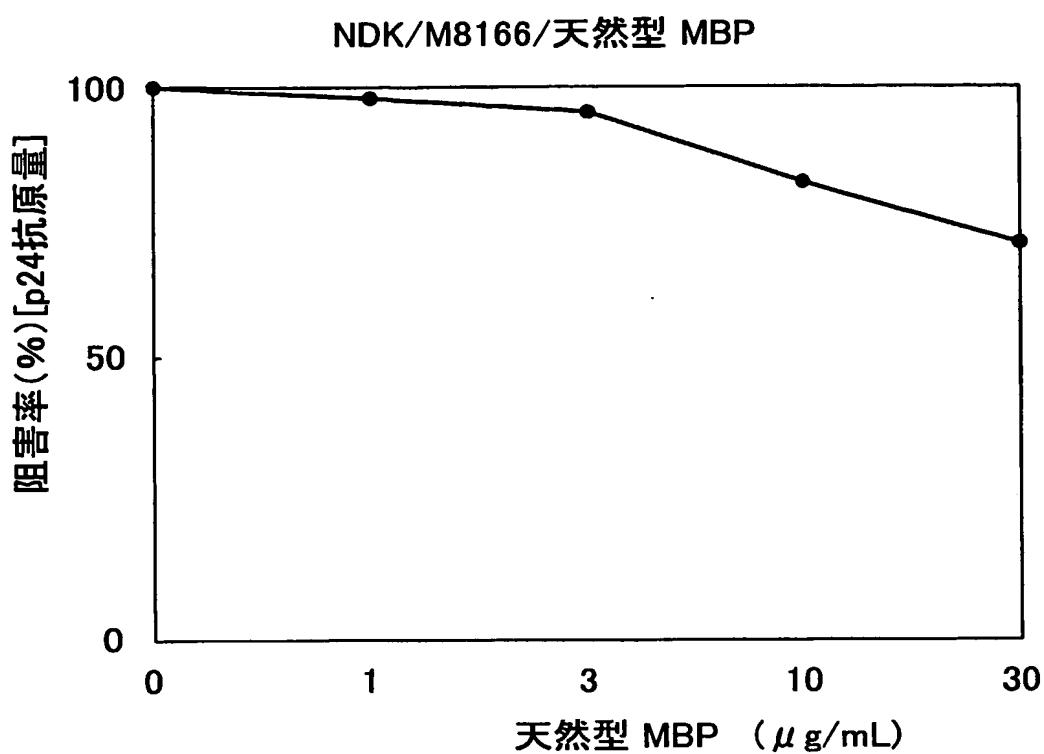
第1図



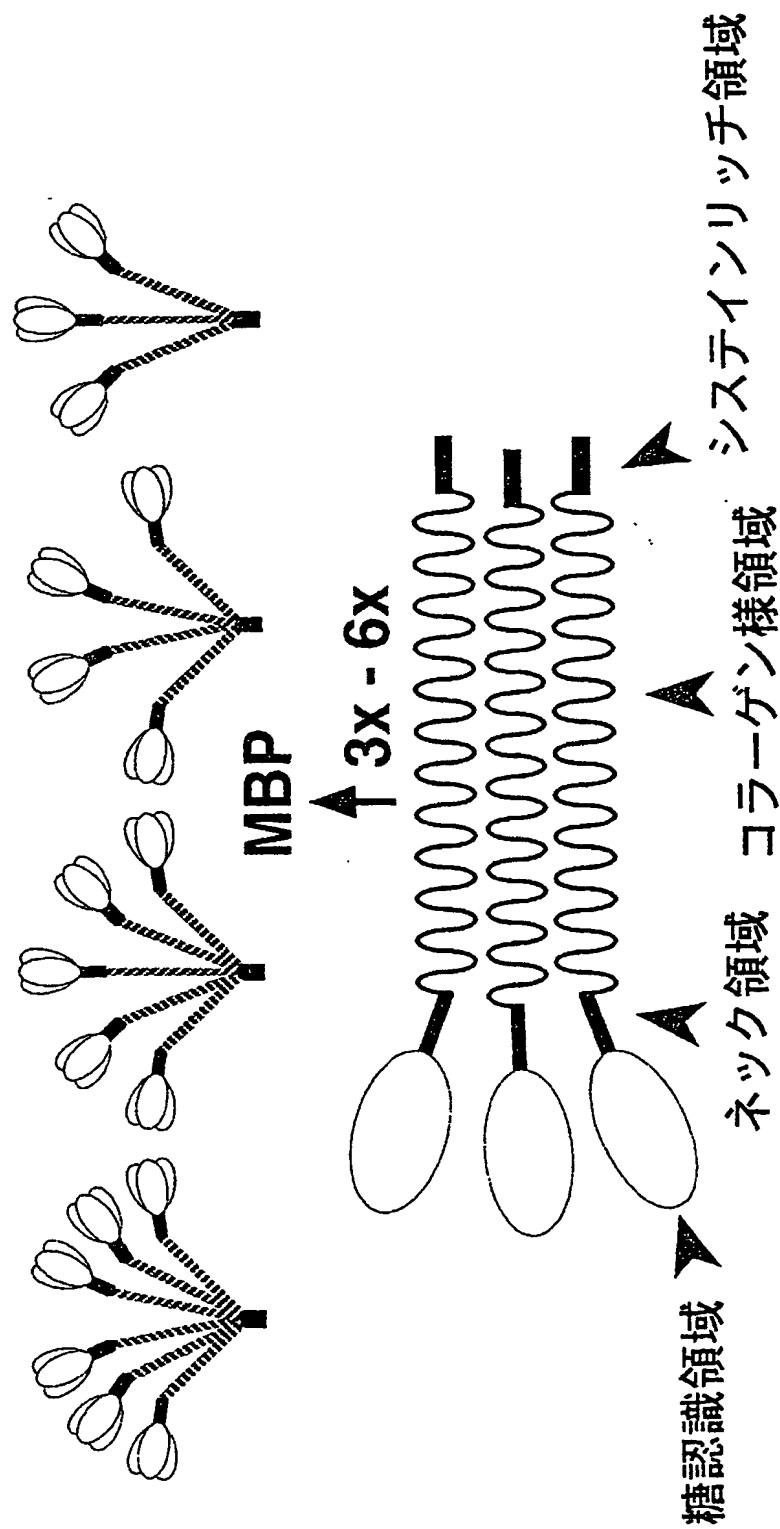
第2図



第3図



第4図



## SEQUENCE LISTING

〈110〉 FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.

〈120〉 Anti-HIV Agent

<130> 03P451W0

〈150〉 JP 2002-189534

〈151〉 2002-06-28

<160> 3

〈210〉 1

〈211〉 3605

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggtaaatatg ttttcattaa ctgagatcaa ccttccctga tttttctcac accaaggta 60  
ggaccatgtc cctgtttcca tcactccctc tccttctcct gagtatggtg gcagcgtctt 120  
actcagaaac tgtgacctgt gaggatgccc aaaagacctg ccctgcagtg attgcctgta 180  
gctctccagg catcaacggc ttcccaggca aagatggcgc tcatggcacc aaggagaaaa 240  
aggggaaacc aggccaaggg ctcagaggct tacagggccc ccctggaaag ttggggccctc 300  
caggaaatcc agggccctctt gggtcaccag gaccaaaggg ccaaaaagga gacctggaa 360  
aaagtccgga tggtgatagt agccctggctg cctcagaaag aaaagctctg caaacagaaa 420  
tggcacgtat caaaaagtgg ctgaccttctt ctctggcaa acaagtggg aacaagttct 480  
tcctgaccaa tggtgaaata atgaccttttgg aaaaagtgaa ggccttgggt gtcaagttcc 540  
aggcctctgt ggccaccccc aggaatgctg cagagaatgg agccattcag aatctcatca 600



catccccaaa tcataagata ttttcatga tttgaaacc atgaagagat tttcatgtat	2400
tttggaaatca tgaagatatt ttccattti ttctaatag ttttattaat aaacattcta	2460
tctattcccg gtagaataga tatccacttg agacagcact atgttaggaaa gaccattti	2520
cctccactga actagggtgg tgcatttttg taagttaggt aactgtatgt gtgtgtgtct	2580
gtttctgggc tgcttattct agtcttatttg ttgtatgtttg tgtcaaacag tacactatct	2640
taattattgt acatttatag ttgttaactgt agtccagctt tgttcitctt caagtcaaga	2700
tttccatata aatatttagaa acagtttctc aatttctaca aaatccgtat gaggtttctt	2760
ctgggaccac attgagtcata tcaatcaact tatgcagaac tggcaactta ctactgaatc	2820
tcaatcaat gttcatcatg tatcgcttca tttaacttagg atttctctaa cttatttgct	2880
atgttttgag atttttagtt taaaaaccctt gtatatcttg ttttgggtggt ttttagtgatt	2940
ttaataatat attttaataa tttttcttt tctattgttg tacacagaaa tacagttaaag	3000
tttttgtgtt agtcttacga tggtagttaa cctcaataaag tttatttctt aaatcttagta	3060
attttagat tcccttgat tttgtataatg catagtcattg taagctgaaa atatggcaat	3120
acttgcttct tcccaattgc tttacccttt ttcttacctt attgcactgg ttagcaaccc	3180
caatacagag accaccagag caggtataga cicctgaaag acaatataat gaagtgctcc	3240
agttaggcct atctaaactg gattcacagc tctgtcactt aattgttaca tgatctagag	3300
ccagttactt tgggtttagt ccattgtatcc gcagctgaga gaaaataatc attcttattt	3360
catgaaaatt gtggggatga tggaaataagt taacaccttt aaagtgtgtta gtaaagtatc	3420
aggataactat attttaggtc ttaatacaca cagttatgcc gctagataca tgctttttaa	3480
tggataatg tgatattata cataacacat atcgatttt aaaaattaaa tcaaccttgc	3540
ttttagtggaa taaactccat ttagtccacaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3600
aaaaaa	3605

<210> 2

<211> 747

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgtccctgt ttccatcaact cccttcctt ctccgtagta tggtgccagc gtcttacca	60
gaaactgtiga cctgtgagga tgcccaaag acctgcctg cagtattgc ctgttagct	120
ccaggcatca acggcttccc aggcaaagat gggcgtagat gcaccaaggg agaaaagggg	180
gaaccaggcc aaggctcag aggcttacag ggccccctg gaaagttggg gcctccagga	240
aatccagggc ttctgggtc accaggacca aagggccaaa aaggagaccc tggaaaaagt	300
cgggatggtg atagtagcct ggctgcctca gaaagaaaag ctctgcaaac agaaatggca	360
cgtatcaaaa agtggctgac ctctctctg ggcaaacaag ttggaaacaa ttcttcctg	420
accaatggtg aaataatgac ctttaaaaaa gtgaaggcct tttgtgtcaa ttccaggcc	480
tctgtggcca cccccaggaa tgctgcagag aatggagcca ttcaaatct catcaaggag	540
gaaggcttcc tggcatcac tgaatgagaag acagaaggc agtttgtga tctgacagga	600
aatagactga cctacacaaa ctggAACGAG ggtGAACCCA ACAATGCTGG ttctgtatgaa	660
gatttgttat tgctactgaa aaatggccag tggaaatgacg tcccctgctc cacctccat	720
ctggccgtct gtggatcc tatctga	747

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala

1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys

20 25 30

Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly

35 40 45

Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly

65	70	75	80
Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp			
85	90	95	
Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg			
100	105	110	
Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe			
115	120	125	
Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu			
130	135	140	
Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala			
145	150	155	160
Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn			
165	170	175	
Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu			
180	185	190	
Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp			
195	200	205	
Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu			
210	215	220	
Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His			
225	230	235	240
Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile			
245			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08259

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, A61P31/18, 37/04, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K38/16, A61P31/18, 37/04, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1992	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-1992	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EZEKOWITZ, R. et al., A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus, Journal of Experimental Medicine, 1989, Vol.169, No.1, Pages 185 to 196	1-17 18-38
X	Tadashi HARADA, "HIV no Kansen o Soshi suru Tanpaku-shitsu", Clinical Immunology, 1989 nen, Vol.21, No.11, pages 1782 to 1787	1-17 18-38
X	Tadashi HARADA et al., "HIV Kansen to Men'eki", Igaku no Ayumi, 1996 nen, Vol.176, No.1, pages 44 to 48	1-17 18-38

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 July, 2003 (29.07.03)Date of mailing of the international search report  
12 August, 2003 (12.08.03)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/08259

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/69894 A2 (THIEL, Steffen), 23 November, 2000 (23.11.00), Full text & JP 2002-544286 A & EP 1181038 A2	1-17 18-38
Y	Jun'ichi MIMAYA et al., "Ketsuyubyo to HIV Kansen no Genjo", Igaku no Ayumi, 1996 nen, Vol.176, No.1, pages 7 to 11	18-38
A	JP 2002-165591 A (JSR Corp.), 11 June, 2002 (11.06.02), Full text (Family: none)	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP03/08259**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 39, 40

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 39 and 40 involves methods for treatment of the human body by surgery or therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1' A61K38/16, A61P31/18, 37/04, 43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1' A61K38/16, A61P31/18, 37/04, 43/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1992

日本国公開実用新案公報 1971-1992

日本国登録実用新案公報 1994-1996

日本国実用新案登録公報 1996-2003

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	EZEKOWITZ, R. et al, A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus, Journal of Experimental Medicine, 1989, Vol. 169, No. 1, pages 185-196	1-17
Y		18-38
X	原田 信志, HIVの感染を阻止する蛋白質, 臨床免疫, 1989年, 第21巻, 第11号, 第1782頁-第1787頁	1-17
Y		18-38

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

29.07.03

## 国際調査報告の発送日

12.08.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

岩下 直人

4C 9841



電話番号 03-3581-1101 内線 3451

## C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	原田 信志 et al, H I V感染と免疫, 医学のあゆみ, 1996年, 第176巻, 第1号, 第44頁-第48頁	1-17
Y		18-38
X	WO 00/69894 A2 (THIEL, Steffen) 2000. 11. 23	1-17
Y	全文 & JP 2002-544286 A & EP 1181038 A2	18-38
Y	三間屋純一 et al, 血友病とH I V感染の現状, 医学のあゆみ, 1996年, 第176巻, 第1号, 第7頁-第11頁	18-38
A	JP 2002-165591 A (ジェイエスアール株式会社) 2002. 06. 11 全文 (ファミリーなし)	1-17

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 39, 40 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲 39, 40 は手術または治療による人体の処置方法を包含するものであるので、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**